

产品组成:

规格	200T
荧光探针 DCFHDA	100u1

储存条件:

-20°C 避光保存。

有效期:

一年。

注意事项:

- 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体收集至管底，避开来盖时液体洒落。
- DCFHDA 荧光探针在 2-8°C 时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
- 荧光探针标记后，一定要洗净残余的未进入细胞内的探针，否则会导致背景较高。
- 探针标记完毕并洗净残余探针后，可以进行激发波长的扫描和发射波长的扫描，以确认探针的标记情况是否正常。
- 尽量缩短探针标记后到测定所用的时间，以减少各种可能的误差。
- 原位检测必须使用荧光检测专用的黑色透明底 96 孔细胞培养板。
- 以下操作步骤仅供参考，请根据实际样本情况调整或参考文献。

产品简介:

活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。DCFH-DA 本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜，从而使探针很容易被标记到细胞内。在活性氧存在的条件下，DCFH 被氧化生成荧光物质 DCF，绿色荧光强度与细胞内活性氧水平成正比，检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。

在激发波长 502 nm，发射波长 530 nm 附近，使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪等检测 DCF 荧光，从而测定细胞内活性氧水平。

试剂盒以外自备仪器和试剂耗材:

仪器准备:	<ul style="list-style-type: none">● 激光共聚焦显微镜或荧光分光光度计或酶标仪或流式细胞仪，激发波长500 ± 15 nm，发射波长530 ± 20 nm，或者按照FITC荧光检测条件检测● 离心机● 移液器● 冰箱● 冰盒
--------------	---

一、探针标记

原位标记：仅适用于贴壁培养细胞。

1. 按照 1:1000-2000 用无酚红无血清培养基稀释 DCFH-DA。

【注】:

- 不能用含有血清的培养基稀释 DCFHDA 探针。
 - 也可以用 HBSS 缓冲液稀释探针。
2. 去除细胞培养基，用 PBS 洗细胞一次。
 3. 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜，通常对于 96 孔板每孔加入 100-200 μL 染色液，六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1 毫升。
 4. 在 37°C 细胞培养箱内避光孵育 20-60 分钟。
 5. 用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

【注】：

- 也可以用 HBSS/PBS 洗涤细胞。
- 对于某些细胞，如果发现细胞荧光太强，超过仪器的检测范围，可以按照 1:2000-1:10000 稀释 DCFH-DA。探针标记的时间也可以根据情况在 15-60 分钟内适当进行调整。

收集后标记：悬浮细胞或贴壁细胞消化处理

1. 按照 1:1000 用无酚红无血清培养基稀释 DCFH-DA。

【注】：

- 不能用含有血清的培养基稀释 DCFHDA 探针。
 - 也可以用 HBSS 缓冲液稀释探针。
2. 离心移除培养基，用 PBS 洗细胞一次。
 3. 细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为 1×10^6 - 2×10^7 /毫升，37°C 细胞培养箱内避光孵育 20-60 分钟。每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。
 4. 用无血清细胞培养基洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。
 5. 用无血清细胞培养基重悬细胞。

【注】：

- 也可以用 HBSS/PBS 洗涤细胞。
- 对于某些细胞，如果发现细胞荧光太强，超过仪器的检测范围，可以按照 1:2000-1:10000 稀释 DCFH-DA。探针标记的时间也可以根据情况在 15-60 分钟内适当进行调整。

二、检测：

对于原位标记探针的样品可以用激光共聚焦显微镜直接观察，或收集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。

对于收集细胞后标记探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

使用 488 nm 激发波长，525 nm 发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF。